

学位授与番号	医博乙第1307号
学位授与年月日	平成6年6月15日
氏名	宮田 勝
学位論文題目	<i>Clostridium difficile</i> 孢子の検出および耐熱性について

論文審査委員	主査 教授 中村 信一
	副査 教授 山本 悦秀
	教授 山本 博

内容の要旨及び審査の結果の要旨

Clostridium difficile (*C. difficile*) は偽膜性大腸炎、一部の抗生物質関連下痢症の原因菌である。これらの疾病において、本菌の孢子は外因感染、再発に重要な役割を演じている。本研究では、*C. difficile* 孢子の検出、耐熱性について検討した。

孢子形成用培地としては変法BHI (m-BHI)、孢子検出用培地としてはグルコースー可溶性デンプンBHI (GS-BHI) 寒天培地を用いた。孢子内Ca濃度は原子吸光法により、ジピコリン酸 (DPA) 濃度は発色法により測定した。成績の概要は以下の如くである。

1) 被験30株共にm-BHIにおいて、光学顕微鏡的には 10^4 /ml以上の孢子形成を示したが、孢子の検出はGS-BHI寒天培地では困難であった。即ちGS-BHI寒天培地における孢子検出率は30株中25株が0.01%以下であり、10%以上の検出率を示した菌株は2株にすぎなかった。2) タウロコール酸塩法 (70℃10分間加熱後、0.1%タウロコール酸ナトリウム添加GS-BHI寒天培地に植菌) とリゾチーム法 (70℃10分間加熱後、チオグリコール酸ナトリウム処理を行い、リゾチーム添加 (10 μ g/ml) GS-BHI寒天培地に植菌) による孢子検出率を比較検討したところ、孢子検出率は前者では $82.2 \pm 16.4\%$ 、後者では $57.2 \pm 21.1\%$ であり、前者の方が孢子検出により有効であった ($P < 0.01$)。3) 4株を用いて孢子に傷害を与える加熱温度を検討した結果、80℃加熱は孢子を傷害することが分かった。また、加熱傷害孢子の検出にはリゾチーム法が有効であった。4) 被験30株ともに100℃10分間加熱に対して耐性を示し、耐熱性孢子数の総孢子数に対する割合は2.5~30.9%であった。また、 D_{90} 値は60分以上、 D_{100} 値は5.5~15.5分を示した。5) 孢子の耐熱性に及ぼす培養液中の金属の影響について、3株を用いて合成培地にて5種類の金属に関し検討した結果、Ca添加の場合の D_{100} 値 (4.3~5.4分) は、Ca不含の場合の D_{100} 値 (2.1~3.3分) の約2倍の値を示し、Caが耐熱性に影響することが分かった。6) 1株を用い孢子のCa、DPA含有量を解析した結果、1mM Ca添加複合培地において形成された孢子のCa、DPA含有量 (Ca, 4.7; DPA, 52 μ g/mg孢子) はCa無添加の場合 (Ca, 2.3; DPA, 32 μ g/mg孢子) に比べ高かった。

以上の結果は *C. difficile* は極めて孢子形成が良好な菌種であり、その孢子の検出には、他のクロストリジウム菌種とは異なり、特別な方法が必要であることを示している。さらに、本菌の孢子の耐熱性は高く、かつ耐熱性にはCa、DPA含有量が関与していることを示唆している。

以上、本研究は *C. difficile* の孢子の性状、特殊性を明らかにしたものであり、医学細菌学、臨床細菌学に寄与する労作と評価された。